

POLYOXYALKYLENE COMPOUND CONTAINING CARBOXY GROUP

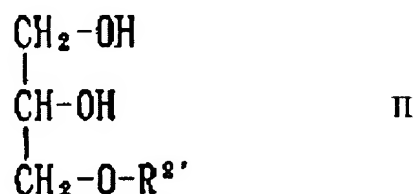
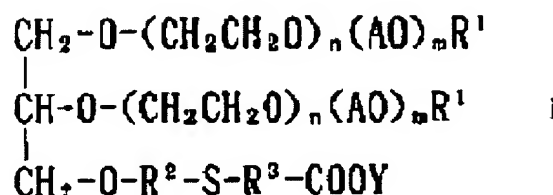
Patent number: JP11228685
Publication date: 1999-08-24
Inventor: KOYAMA YOSHIYUKI; MITSUCHIKA KOUZOU;
 YASUKOCHI TORU
Applicant: NOF CORP
Classification:
 - international: C08G65/32
 - european:
Application number: JP19980029651 19980212
Priority number(s):

Also published as:

 JP11228685 (A)

Abstract of JP11228685

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject compound capable of manifesting reduction of antigenicity, stabilization, elongation of a retention time, and the like, of a medicine, and useful for a drug delivery system or the like by introducing polyoxyalkylene chains to the α - and β -positions and an (activated) carboxyl to the γ -position, of glycerol.
SOLUTION: The objective compound is the compound of formula I [$R<1>$ is H, a 1-24C hydrocarbon group or a 1-24C acyl; $R<2>$ is a 3-4C hydrocarbon group; $R<3>$ is a 1-10C hydrocarbon group; AO is a 3-4C oxyalkylene; Y is H, 2,4-dioxopyrrolidinyl, p-nitrophenyl; (m) and (n) are each the number of mean addition mols, and (n) is 1-1,000 and $(n)/(m+n) \geq 0.8$], for example, is obtained by adding ethylene oxide or a mixture of the ethylene oxide and a 3-4C alkylene oxide to a compound of formula II ($R<2>$ is a hydrocarbon group containing a polymerizable unsaturated group), optionally alkylating or acylating the OH end, reacting a compound of the formula $HS-R<3>-COOH$ with the obtained product, and optionally reacting N-hydroxysuccinimide or p-nitrophenol:



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-228685

(43) 公開日 平成11年(1999) 8月24日

(51) Int.Cl.⁶

C 0 8 G 65/32

識別記号

F I

C 0 8 G 65/32

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願平10-29651

(22) 出願日 平成10年(1998) 2月12日

(71) 出願人 000004341

日本油脂株式会社

東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号

(72) 発明者 小山 義之

神奈川県川崎市宮前区鷺沼 1-18-11-403

(72) 発明者 三近 幸三

神奈川県川崎市川崎区藤崎 2-3-9

(72) 発明者 安河内 徹

神奈川県川崎市川崎区藤崎 2-3-10

(74) 代理人 弁理士 高島 一

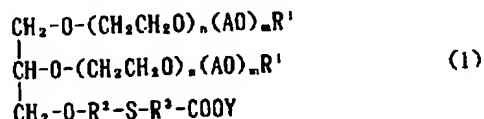
(54) 【発明の名称】 カルボキシル基含有ポリオキシアルキレン化合物

(57) 【要約】

【課題】 ポリペプチド、生理活性蛋白質、酵素などのアミノ基や水酸基と容易に反応することができ、かつ当該物質の抗原性の低減、安定化、体内(血中)滞留時間の延長などの性能が発揮でき、毒性も少なく、さらに副生物の生成が少ないカルボキシル基含有ポリオキシアルキレン化合物を提供すること。

【解決手段】 式(1)で表されるカルボキシル基含有ポリオキシアルキレン化合物。

【化1】



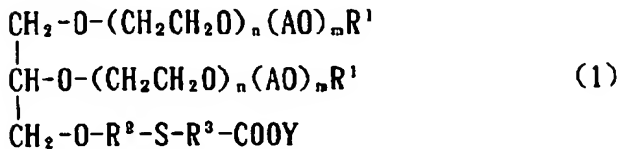
(式中、R¹ は水素原子、炭素数1~24の炭化水素基または炭素数1~24のアシル基を、R² は炭素数3または4の炭化水素基を、R³ は炭素数1~10の炭化水素基を、AOは炭素数3または4のオキシアルキレン基を、Yは水素原子、活性基を示し、nはオキシエチレン基の平均付加モル数で1~1000であり、mは炭素数

3または4のオキシアルキレン基の平均付加モル数であって、n/(n+m)は0.8以上であり、オキシエチレン基と炭素数3または4のオキシアルキレン基の付加状態はブロック状でもランダム状でもよい)

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 式 (1) で表されるカルボキシル基含有ポリオキシアルキレン化合物。

【化 1】

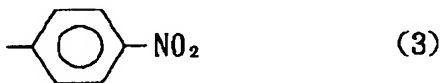


(式中、 R^1 は水素原子、炭素数 1～24 の炭化水素基または炭素数 1～24 のアシル基を、 R^2 は炭素数 3 または 4 の炭化水素基を、 R^3 は炭素数 1～10 の炭化水素基を、 AO は炭素数 3 または 4 のオキシアルキレン基を、 Y は水素原子、式 (2) あるいは式 (3) で示される活性基を示し、 n はオキシエチレン基の平均付加モル数で 1～1000 であり、 m は炭素数 3 または 4 のオキシアルキレン基の平均付加モル数であって、 $n/(n+m)$ は 0.8 以上であり、オキシエチレン基と炭素数 3 または 4 のオキシアルキレン基の付加状態はブロック状でもランダム状でもよい)

【化 2】



【化 3】



【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明はグリセリンの α 、 β 位にポリオキシアルキレン鎖を持ち、 γ 位にカルボキシル基または活性化されたカルボキシル基を有するポリオキシアルキレン化合物に関する。さらに詳しくは、ポリペプチド、生理活性蛋白質、酵素などへのポリオキシアルキレン修飾や、リボソーム、ポリマーミセルなど薬物送達システム（以下「ドラッグデリバリーシステム」という）におけるポリオキシアルキレン修飾など、主として医薬用途でのポリオキシアルキレン修飾に用いられる末端カルボキシル基を有するポリオキシアルキレン化合物に関する。

【0002】

【従来の技術】 これまでポリオキシアルキレングリコールの末端水酸基をカルボキシル基に置換した化合物は、たとえば、特公昭 63-4877 号公報には潤滑油として、あるいは特開昭 63-182343 号公報には合成樹脂添加剤として記載されており、幅広く利用されている。近年になり、ポリオキシアルキレン化合物は、ドラッグデリバリーシステムの重要な担体として注目を集め

ようになり、ポリオキシアルキレン化合物にアミノ基やカルボキシル基を導入した化合物についても研究が盛んに行われるようになってきている。なかでも、2本のポリオキシアルキレン鎖を持つ化合物として、特開平 3-72469 号公報に示されているトリアジン環を介した 2, 4-ビス (O-メトキシポリエチレングリコール)-6-クロロ-S-トリアジン (以下「活性化 PEG 2」ともいう) が知られている。また、ポリオキシアルキレン基の側鎖に多数のカルボキシル基を持つポリオキシアルキレン化合物も知られている (特開平 8-48763 号公報)。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 特に、ポリオキシアルキレン化合物にて修飾した化合物ないしは薬剤 (例えば、蛋白質、生理活性物質、DNA 等)、該修飾を利用するドラッグデリバリーシステムにおいては、①抗原性 (免疫反応性) の低減、②化合物ないしは薬剤としての安定性の増加、③体内滞留時間の延長などの効果が得られるとされている。ところが、これら従来のカルボキシル基含有ポリオキシアルキレン化合物は、例えば一本鎖の末端カルボキシル基含有ポリオキシアルキレン化合物の場合、これを用いて対象物質を修飾すると、一本鎖であるが故に、ポリオキシアルキレンの持つ抗原性の低減、対象物質の安定化などの性能が十分に発揮できないケースが多々ある。また、前述した活性化 PEG 2 は、トリアジン環を持つため、医薬品として体内に投与した場合、毒性が生じる可能性がある。さらに、ポリオキシアルキレン骨格の側鎖に多数のカルボキシル基を持つものは、反応点が多数あるため修飾反応を制御するのが難しく、単一の化合物を得ることが困難である。

【0004】 本発明の目的は、化合物ないしは薬剤の抗原性の低減、安定化、体内 (血中) 滞留時間の延長などの目的をもって、化合物ないしは薬剤を修飾するために使用され、しかも修飾された化合物ないしは薬剤は毒性が少なく、さらに副生物の生成が少ないカルボキシル基含有ポリオキシアルキレン化合物を提供することである。

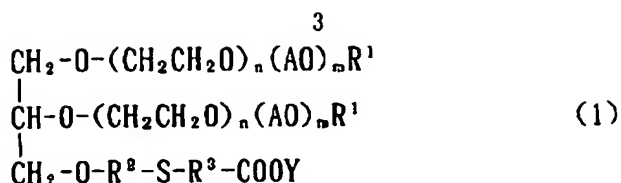
【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、グリセリンの α 、 β 位にポリオキシアルキレン鎖を持ち、 γ 位にカルボキシル基あるいは N-ヒドロキシコハク酸イミドによって活性化されたカルボキシル基を有するポリオキシアルキレン化合物が、上記した目的を達成できることを見出し、本発明に到達した。

【0006】 すなわち本発明は、式 (1) で表されるカルボキシル基含有ポリオキシアルキレン化合物。

【0007】

【化 4】



【0008】(式中、 R^1 は水素原子、炭素数1～24の炭化水素基または炭素数1～24のアシル基を、 R^2 は炭素数3または4の炭化水素基を、 R^3 は炭素数1～10の炭化水素基を、AOは炭素数3または4のオキシアルキレン基を、Yは水素原子あるいは式(2)あるいは式(3)で示される活性基を示し、nはオキシエチレン基の平均付加モル数で1～1000であり、mは炭素数3または4のオキシアルキレン基の平均付加モル数であって、 $n/(n+m)$ は0.8以上であり、オキシエチレン基と炭素数3または4のオキシアルキレン基の付加状態はブロック状でもランダム状でもよい)

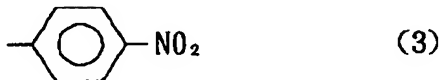
【0009】

【化5】



【0010】

【化6】



【0011】

【発明の実施の形態】式(1)において、 R^1 で示される炭素数1～24の炭化水素基としては、脂肪族炭化水素基として、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、第三ブチル基、ペンチル基、イソペンチル基、ヘキシル基、イソヘキシル基、2-エチルヘキシル基、オクチル基、イソノニル基、デシル基、ドデシル基、イソトリデシル基、テトラデシル基、ヘキサデシル基、イソセチル基、オクタデシル基、イソステアリル基、オクチルドデシル基、ドコシル基およびデシルテトラデシル基などの直鎖または分枝状のアルキル基など；芳香族炭化水素基として、ブチルフェニル基、ジブチルフェニル基、オクチルフェニル基、ジノニルフェニル基および α -メチルベンジルフェニル基などのアリール基、ベンジル基などのアラールキル基、およびクレジル基などが挙げられる。

【0012】また、炭素数1～24のアシル基としては、酢酸、プロピオン酸、酪酸、イソ酪酸、カプリル酸、2-エチルヘキサン酸、イソノナン酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、イソパルミチン酸、ステアリン酸、イソステアリン酸、アラキン酸、ペヘン酸、パルミトレイン酸、安息香酸、ヒドロキシ安息香酸、桂皮酸、没食子酸などに由来するアシ

4

ル基が挙げられる。これらのなかでも、 R^1 としては、水素原子および炭素数1～4の直鎖のアルキル基が好ましい。なお、式(1)中には R^1 が2つ存在するが、これらは同一または異なってもよい。

【0013】 R^2 で示される炭素数3または4の炭化水素基としては、重合性不飽和基をもつ炭化水素基に由来する基、好ましくはアリル基、メタリル基など二重結合をもつアルキル基に由来する基、トリメチレン基、ブチレン基等の直鎖または分枝状のアルキレン基などが挙げられる。

【0014】 R^3 で示される炭素数1～10の炭化水素基としては、メチレン基、エチレン基、プロピレン基およびトリメチレン基などの直鎖または分枝状のアルキレン基、フェニレン基、ベンジル基などの2価の芳香族炭化水素基が挙げられる。なかでも、メチレン基およびエチレン基が好ましい。

【0015】AOで示される炭素数3または4のオキシアルキレン基のアルキレン部位は、直鎖または分枝状のいずれでもよく、このようなオキシアルキレン基として、たとえば、オキシプロピレン基、オキシトリメチレン基、オキシブチレン基、オキシテトラメチレン基などが挙げられる。

【0016】Yは、水素原子、式(2)または式(3)で表される活性基であるが、対象物質との反応性の点から式(2)および式(3)で表される活性基が好ましい。

【0017】nはオキシエチレン基の平均付加モル数で1～1000であり、mは炭素数3または4のオキシアルキレン基の平均付加モル数であって、 $n/(n+m)$ は0.8以上であり、オキシエチレン基と炭素数3または4のオキシアルキレン基の付加状態はブロック状でもランダム状でもよい。

【0018】一般式(1)で表される本発明のカルボキシル基含有ポリオキシアルキレン化合物は、例えば、以下のようにして製造することができる。まず式(4)

【0019】

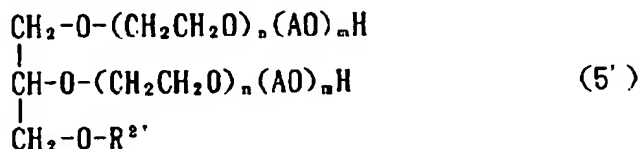
【化7】



【0020】(式中、 $\text{R}^{2'}$ は重合性不飽和基をもつ炭化水素基、好ましくはアリル基あるいはメタリル基などの炭素数3または4の二重結合含有アルキル基を示す)で表される化合物に、エチレンオキシド単独、あるいはエチレンオキシドおよび炭素数3または4のアルキレンオキシドとを付加させる。この際、化合物(4)にエチレンオキシドを付加させた後、炭素数3または4のアルキレンオキシドを付加させてもよいし、エチレンオキシド

とアルキレンオキシドとを混合して一度に付加反応を行ってもよい。エチレンオキシドと炭素数 3 または 4 のアルキレンオキシドの付加モル数の比率は、全体のオキシアルキレン鎖の親水性を保つため、オキシエチレン基が 80% 以上になるようにする。

【0021】具体的には、まず化合物 (4) を反応釜に仕込み、窒素置換を行い、100~140℃でアルキレンオキシド (エチレンオキシド単独、あるいはエチレン*

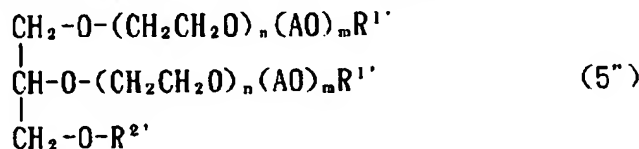


【0023】(式中の記号は前記と同義)で表される化 ※ (5'')

合物を得る。必要に応じて末端水酸基をアルキル化あるいはアシル化するなど、炭化水素基の導入を行って、式※

【0024】

【化9】



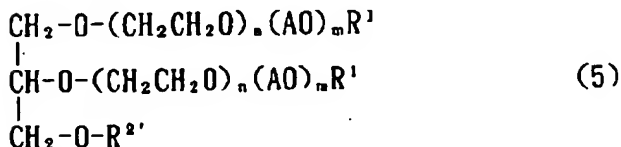
【0025】(式中、R^{1'} は炭素数 1~24 の炭化水素基または炭素数 1~24 のアシル基を示し、その他の記号は前記と同義)で表される化合物となる。

【0026】例えば、アルキル化反応は、R¹ で示される炭化水素基を有するアルキルクロライド (ハロゲン化アルキル)、アルケニルクロライドなどのアルキル化剤を、化合物 (5') の水酸基に対して 1.1~3.0 倍モル加え、90~120℃で 2~5 時間反応を行い、水洗し、未反応物を除去し、中和、脱水、濾過を行う。アシル化反応は、R¹ で示されるアシル基を有するハロゲン化アシルやカルボン酸無水物などのアシル化剤を、化合物 (5') の水酸基に対して 1.1~2.0 倍モル加え、p-トルエンスルホン酸存在下、110~140℃で 9 時間、脱水縮合反応を行い、吸着剤処理し、脱水、濾過する。上記したハロゲン化物やカルボン酸無水物中の R¹ が芳香族炭化水素基である化合物を用いた場合、芳香族炭化水素基が導入される。この場合の反応条件も上記したアルキル化、アシル化に準じる。

【0027】このようにして得た式 (5)

【0028】

【化10】



【0029】(式中の各記号は前記と同義)で表される化合物に、式 (6)



*オキシドと炭素数 3 または 4 のアルキレンオキシドとの混合物)を圧入し、反応させる。反応終了後、減圧下で未反応アルキレンオキシドを除去し、80℃に冷却し、リン酸、塩酸などの酸を加えて中和し、脱水、濾過を行い、式 (5')

【0022】

【化8】

(式中、R³ は前記と同義)で表される化合物を、化合物 (5) 中のアリル基またはメタリル基に対して 1.5~10 倍モル加え、例えばメタノール、エタノールなどのアルコール中で 30~40℃で 3~7 時間反応させ、カルボキシル基の導入を行う。反応終了後、アルコールを留去し、反応混合物をクロロホルムやジクロロメタンなどの溶媒に溶解し、その後水洗して未反応の化合物 (6) を除去する。ついで溶媒を留去し、濾過し、式 (1) (ただし、式中の Y は水素原子) の化合物を得る。

【0030】その後、例えばジメチルホルムアミド、クロロホルム、トルエンなどの溶媒中、ジシクロヘキシルカルボジイミド存在下で、N-ヒドロキシコハク酸イミドまたは p-ニトロフェノールを 30~40℃で反応させ、濾過後、イソプロピルアルコールやヘキサンで晶析を行うことによって、カルボキシル基が活性化された、式 (1) (ただし、式中の Y は式 (2) または (3) の活性基) の化合物となる。

【0031】本発明のカルボキシル基含有ポリオキシアルキレン化合物は、例えば (1) 抗腫瘍蛋白質であるアスパラギナーゼ、アルギナーゼなどに対する修飾、

(2) 代謝異常酵素であるアデノシンデアミナーゼ、インスリン、ウリカーゼなどに対する修飾、(3) 抗原蛋白質である免疫グロブリン、血清アルブミンなどに対する修飾、(4) 抗炎症酵素であるカタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼなどに対する修飾、(5) 血液成分蛋白質であるアルブミン、顆粒球コロニー刺激因子などに対する修飾に使用することが考えられる。また、ドラッグデリバリーシステムへの利用としては、制癌剤で

あるアドレマイシン、シスプラチンなどを内包するリポソームの基剤であるリン脂質への化学修飾などが考えられる。いずれも、ポリオキシアルキレン基で修飾されることにより、免疫原性の向上、薬物の安定化、血中滞留時間の延長などの効果が期待される。

【0032】

【実施例】以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明する。

製造例 1

グリセリンモノアリルエーテル 66 g (0.5 モル) と水酸化カリウム 1 g を 5 リットル容オートクレーブに仕込み、系内を窒素ガスに置換した後、120℃に昇温した。次いでエチレンオキシド 2440 g (55 モル) を圧入後、130±5℃で 1 時間反応を行った。次いで、窒素ガスを通じながら減圧下 (200 mmHg、0.5 時間) で未反応のエチレンオキシドを除去し、80℃まで冷却した。その後、10 重量%塩酸水溶液で pH を 7.0 に調整し、100±5℃で 100 mmHg、1 時間脱水を行った。次いで反応混合物を 80℃に冷却し、*

*析出した塩を濾別して化合物 2380 g を得た。

【0033】得られた化合物の水酸基価は、22.4 (計算値は 23.0)、不飽和度は 0.19 (計算値は 0.2) であった。なお、水酸基価は JIS K-15576.4 (1970) の方法に準じて、不飽和度は JIS K-15576.7 (1970) の方法に準じて測定した。

【0034】化合物の赤外線吸収スペクトルを図 1 に示す。ゲルパーミエーションクロマトグラフィー (以下「GPC」という) の分析結果を図 2 および表 1 に示す。GPC の分析条件は以下の通りである。

- ・GPC システム: SYSTEM-11 (昭和電工)
- ・GPC カラム: SHODEX KF-804L × 3
- ・展開液: THF
- ・流速: 1 ml/min
- ・サンプル濃度: 0.15 wt%
- ・カラムオープン温度: 40℃

【0035】

【表 1】

ピーク情報	時間 (分)	分子量	高さ
開始	19.9	20759	2
頂点	22.339	5193	34156
終了	25.3	1114	0
数平均分子量 (MN)	5131		
重量平均分子量 (MW)	5268		

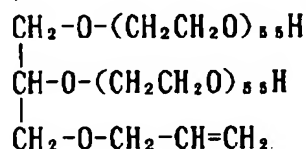
【0036】¹H-NMR スペクトルの結果は以下の通りである。

¹H-NMR (δ (ppm), CDCl₃/TMS)

δ = 5.2 ppm (C=CH₂)

δ = 5.9 ppm (-CH=)

※



(7)

【0039】で表される化合物 (分子量: 5009) と推定した。

【0040】製造例 2

グリセリンモノアリルエーテル 66 g (0.5 モル) と水酸化カリウム 0.6 g を 5 リットル容オートクレーブに仕込み、系内を窒素ガスに置換した後、100℃に昇温した。次いで、エチレンオキシド 1340 g (30 モル)、プロピレンオキシド 110 g (2 モル) を計量槽に計り取り、均一になるまで混合した。110±5℃、10 kg/cm² 以下の条件で計量槽よりエチレンオキシドとプロピレンオキシド混合物を 8 時間かけて圧入した。圧入後 1 時間反応を行い、次いで、窒素ガスを通じ

※【0037】出発原料、反応条件及び上記の分析値より、得られた化合物は式 (7)

【0038】

【化 11】

ながら 200 mmHg の減圧下、30 分間で未反応のエチレンオキシドとプロピレンオキシドを除去した後、80℃まで冷却した。その後、10 重量%塩酸水溶液で pH を 7.0 に調整し、100±5℃、100 mmHg の条件で 1 時間脱水を行った。次に 80℃に冷却して、析出した塩を濾別して化合物 1440 g を得た。

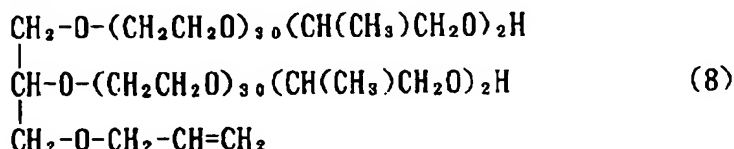
【0041】得られた化合物の水酸基価は、36.4 (計算値は 36.2)、不飽和度は 0.30 (計算値は 0.32) であった。なお、水酸基価および不飽和度は、製造例 1 と同様にして測定した。GPC の分析結果を図 3 および表 2 に示す。GPC の分析条件は製造例 1 とした。

【0042】

* * 【表2】

ピーク情報	時間 (分)	分子量	高さ
開始	21.2	9539	1
頂点	23.341	3082	24069
終了	25.6	953	36
数平均分子量 (MN)		2969	
重量平均分子量 (MW)		3061	

【0043】出発原料、反応条件及び上記の分析値より、得られた化合物は式(8) ※【0044】



【0045】で表される化合物(分子量: 3082)と推定した。

【0046】製造例3

製造例2で得られた式(8)の化合物1000g(0.32mol)と水酸化カリウム150gを、5リットルオートクレーブに仕込み、系内を窒素ガスに置換した後、100℃に昇温した。次いでメチルクロライド43.5g(0.84mol)を100±5℃の条件下で仕込んだ。4時間反応後、80℃に冷却し、窒素ガスを通じながら減圧下(200mmHg以下)で0.5時間、未反応のメチルクロライドを除去した。次いで500gの水を系中に加え攪拌を行った後、静置して分層を行い★

★下層の過剰のアルカリ分を取り除いた。その後、10重量%塩酸水溶液でpHを7.0に調整し、100±5℃、100mmHgの条件下で1時間脱水を行った。次に80℃に冷却し、析出した塩を濾別して化合物955gを得た。

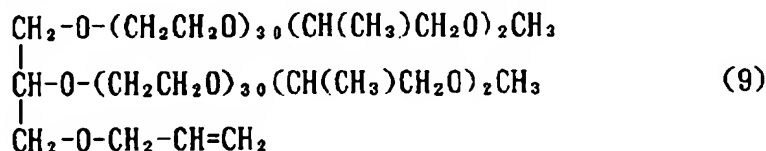
【0047】得られた化合物の水酸基価は0.04(計算値は0)、不飽和度は0.29(計算値は0.32)であった。なお、水酸基価および不飽和度は製造例1と同様にして測定した。GPCの分析結果を図4および表3に示す。GPCの分析条件は製造例1と同じとした。

【0048】

【表3】

ピーク情報	時間 (分)	分子量	高さ
開始	21.3	9029	2
頂点	23.327	3106	25082
終了	25.4	1057	28
数平均分子量 (MN)		2987	
重量平均分子量 (MW)		3075	

【0049】出発原料、反応条件及び上記の分析値より、得られた化合物は式(9) ☆【0050】



【0051】で表される化合物(分子量: 3110)と推定した。

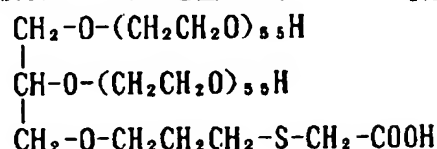
【0052】実施例1

四つ口フラスコに式(6)の化合物としてメルカプト酢酸(HSCH₂COOH)37g(0.4mol)を入

れ、攪拌しながら温度を35±5℃に保持した。次いで製造例1で合成した式(7)の化合物500g(0.1mol)をメタノール500gに溶解させ、滴下ロートにより四つ口フラスコに5時間かけて滴下した。全量滴下終了後、さらに40±5℃で5時間保持して反応を続け

た。次に $60 \pm 10^\circ\text{C}$ 、 200 mmHg 以下の減圧下でメタノールを留去したのち、反応混合物をクロロホルム 1000 g に再び溶解させた。次に全量を分液ロートに移し、飽和食塩水 1 リットルで 3 回水洗し、未反応のメルカプト酢酸を除去した。次いで $110 \pm 10^\circ\text{C}$ 、窒素雰囲気下、 50 mmHg 以下の減圧下でクロロホルムおよび水を留去し、析出した食塩を濾過により除去し、化合物（分子量： 5054 ） 472 g を得た。

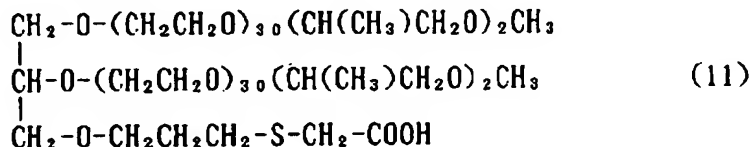
【0053】得られた化合物の酸価は 11.6 （計算値は 11.2 ）、不飽和度 0.01 （計算値は 0 ）であった。なお、酸価は JIS K-1557、 6.6 （ 1970 ）の方法に準じて測定し、不飽和度は製造例 1 と同様に測定した。赤外線吸収スペクトルを図 5 に示す。



【0056】で表される化合物と推定した。

【0057】実施例 2

四つ口フラスコに式（6）の化合物としてメルカプト酢酸（ HSCH_2COOH ） 59 g （ 0.64 モル）を入れ、かき混ぜながら温度を $35 \pm 5^\circ\text{C}$ に保持した。次いで製造例 3 で合成した式（9）の化合物 500 g （ 0.16 モル）をメタノール 500 g に溶解させ、滴下ロートにより四つ口フラスコに 5 時間かけて滴下した。全量滴下終了後、さらに $40 \pm 5^\circ\text{C}$ で 5 時間保持して反応を続けた。次に $60 \pm 10^\circ\text{C}$ 、 200 mmHg 以下の減圧下でメタノールを留去したのち、クロロホルム 1000 g に再び溶解させた。次に全量を分液ロートに移し、飽和食塩水 1 リットルで 3 回水洗し、未反応のメルカプト酢酸を除去した。次いで $110 \pm 10^\circ\text{C}$ 、窒素雰囲気下、 50 mmHg 以下の減圧下でクロロホルムおよび水を留去し、析出した食塩を濾過により除去し、化合物（分子量： 3169 ） 470 g を得た。



【0062】で表される化合物と推定した。

【0063】実施例 3

四つ口フラスコに式（6）の化合物として 3-メルカプトプロピオン酸（ $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ） 42 g （ 0.4 モル）を入れ、かき混ぜながら温度を $35 \pm 5^\circ\text{C}$ に保持した。次いで製造例 1 で合成した式（7）の化合物 500 g （ 0.1 モル）をメタノール 500 g に溶解させ、滴下ロートにより四つ口フラスコに 5 時間かけて滴下した。全量滴下後、さらに $40 \pm 5^\circ\text{C}$ で 5 時間保持して反応を続けた。次に $60 \pm 10^\circ\text{C}$ 、 200 mmHg

*す。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの結果は以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$ (δ (ppm), CDCl_3/TMS)

$\delta = 1.85\text{ ppm}$ ($-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{COOH}$)

$\delta = 2.75\text{ ppm}$ ($-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{COOH}$)

$\delta = 3.2\text{ ppm}$ ($-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{COOH}$)

【0054】出発原料、反応条件および上記の分析値より、得られた化合物は式（10）

【0055】

【化 14】

(10)

※【0058】得られた化合物の酸価は 17.7 （計算値は 17.5 ）、不飽和度 0.01 （計算値は 0 ）であった。なお、酸価の測定は実施例 1 と、不飽和度の測定は製造例 1 と同様にを行った。

【0059】 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの結果を以下に示す。

$^1\text{H-NMR}$ (δ (ppm), CDCl_3/TMS)

$\delta = 1.85\text{ ppm}$ ($-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{COOH}$)

$\delta = 2.75\text{ ppm}$ ($-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{COOH}$)

$\delta = 3.2\text{ ppm}$ ($-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{COOH}$)

【0060】出発原料、反応条件および上記の分析値より、得られた化合物は式（11）

【0061】

【化 15】

g 以下の減圧下でメタノールを留去したのち、クロロホルム 1000 g に再び溶解させた。次に全量を分液ロートに移し、飽和食塩水 1 リットルで 3 回水洗し、未反応のメルカプトプロピオン酸を除去した。次いで $110 \pm 10^\circ\text{C}$ 、窒素雰囲気下、 50 mmHg 以下の減圧下でクロロホルムおよび水を留去し、析出した食塩を濾過により除去し、化合物（分子量： 4878 ） 472 g を得た。

【0064】得られた化合物の酸価は 11.5 （計算値は 11.2 ）、不飽和度 0.01 （計算値は 0 ）であっ

13

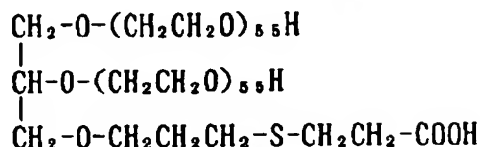
た。なお、酸価の測定は実施例 1 と、不飽和度の測定は製造例 1 と同様に行った。

【0065】¹H-NMR スペクトルの結果を以下に示す。

¹H-NMR (δ (ppm), CDCl₃/TMS)

δ = 1.85 ppm (—O—CH₂CH₂CH₂—S—CH₂CH₂—COOH)

δ = 2.75 ppm (—O—CH₂CH₂CH₂—S—CH₂CH₂—COOH) *



(12)

【0068】で表される化合物と推定した。

【0069】実施例 4

四つ口フラスコに実施例 1 で得られた式 (10) の化合物 300 g (0.06 mol) とジメチルホルムアミド 450 g を入れ、かき混ぜながら温度を 50℃ まで昇温し溶解した。次いで温度を 35 ± 5℃ まで冷却し、窒素雰囲気下で N-ヒドロキシコハク酸イミド 8.3 g (0.07 mol)、ジシクロヘキシルキシルカルボジイミド 14.7 g (0.07 mol) を加え 2 時間反応を行った。反応終了後、加圧濾過を行い得られた溶液に、-10℃ に冷却したイソプロピルアルコール 5 リットルを加え、0.5 時間、室温で攪拌を行い、ポリオキシアルキレン化合物の結晶を析出させた。得られた結晶を減圧濾過に※

14

*δ = 2.85 ppm (—O—CH₂CH₂CH₂—S—CH₂CH₂—COOH)

δ = 2.81 ppm (—O—CH₂CH₂CH₂—S—CH₂CH₂—COOH)

【0066】出発原料、反応条件および上記の分析値より、得られた化合物は式 (12)

【0067】

【化 16】

※より分取した後、再び -10℃ に冷却した後に、イソプロピルアルコール 5 リットルを加え、0.5 時間洗浄を行った。減圧濾過により再び結晶を取り出した後、ヘキサン 10 リットルを加え洗浄を行った。最後に得られた結晶を真空乾燥機を使用して 35℃、50 mmHg 以下で 4 時間真空乾燥を行い、化合物 (分子量: 5147) 245 g を得た。

【0070】化合物の赤外線吸収スペクトルを図 6 に示す。¹H-NMR スペクトルの結果を以下に示す。

¹H-NMR (δ (ppm), CDCl₃/TMS)

【0071】

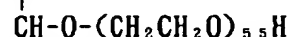
【化 17】



【0072】出発原料、反応条件および上記の分析値より、得られた化合物は式 (13)

★【0073】

★【化 18】



(13)



【0074】で表される化合物と推定した。

【0075】試験例 1

L-アスパラギナーゼ 10 mg を含む 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 10) 2 ml に、実施例 3 で得られた式 (13) の化合物をアスパラギナーゼ分子中のアミノ基に対して 15 倍モル比加え、37℃ で 1 時間反応させた。常法により精製し、白色粉末の修飾アスパラギナーゼを得た。分子量は 40 万であり、アミノ基の分析の結果、

52 個が結合していたので、付加部分の分子量 52 × 5150 = 約 26.7 万とアスパラギナーゼの分子量 13.4 万との合計値とほぼ一致した。このものは抗体との結合能は完全に消失しているが、酵素活性は A 法で 37%、B 法で 41% 保持していた。これらの結果を表 4 に示す。

【0076】なお、アスパラギナーゼ分子中の結合したアミノ基の数の測定は、トリニトロベンゼンスルホン酸

を用いて測定を行った。また、酵素活性の測定は、L-グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼを用い、リンゴ酸の生成に伴うNAD⁺の変化量を分光学的に測定する方法（A法）、及びアスパラギン酸とヒドロキシアミン共存下における同酵素によるアスパラギン酸ヒドロキサメートの生成を塩化第二鉄による発色させる方法（B法）により測定した。さらに抗原性の測定は、ウサギをL-アスパラギナーゼで免疫した抗血清を用

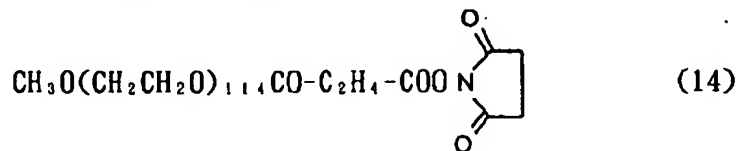
い、抗原-抗体反応により生じる沈澱量を測定する方法により行い、抗体との結合能（抗原性）を測定した。

【0077】比較試験例1

L-アスパラギナーゼ10mgを含む0.1Mホウ酸緩衝液（pH10）2mlに式（14）

【0078】

【化19】



【0079】の化合物をアスパラギナーゼ分子中のアミノ基に対して11倍モル比加え、37℃で1時間反応させた。常法により精製し、白色粉末の修飾アスパラギナーゼを得た。分子量は42万であり、アミノ基の分析結果、54個が結合していたので、付加部分の分子量54×5200=約28万とアスパラギナーゼの分子量13.4万との合計値とほぼ一致した。そして、このものは抗体との結合能は35%になった。酵素活性はA法で15%、B法で22%保持していた。これらの結果を表4に示す。

【0080】なお、アスパラギナーゼ分子中の結合したアミノ基の数の測定は、トリニトロベンゼンスルホン酸

を用いて測定を行った。また、酵素活性の測定は、L-グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼを用い、リンゴ酸の生成に伴うNAD⁺の変化量を分光学的に測定する方法（A法）及びアスパラギン酸とヒドロキシアミン共存下における同酵素によるアスパラギン酸ヒドロキサメートの生成を塩化第二鉄による発色させる方法（B法）により測定した。さらに抗原性の測定は、ウサギをL-アスパラギナーゼで免疫した抗血清を用い、抗原-抗体反応により生ずる沈澱量を測定する方法により行い、抗体との結合能（抗原性）を測定した。

【0081】

【表4】

	PEG誘導体 (Mw)	結合したアミノ 基の数 ^{a)}	酵素活性		抗体との 結合能
			A法	B法	
試験例1	5,417	52	37	41	0
比較 試験例1	5,200	54	15	22	35

a):アスパラギナーゼ分子中のアミノ基（92個）のうち、化合物が結合したアミノ基の数

【0082】

【発明の効果】本発明の化合物は、γ位の末端にカルボキシル基または活性化されたカルボキシル基を有するため、ポリペプチド、生理活性蛋白質、酵素等のアミノ基や水酸基と容易に反応することができ、かつグリセリンのα、β位のポリオキシアルキレン鎖によって、当該物質の抗原性の低減、安定化、体内（血中）滞留時間の延長等の性能が発揮でき、毒性も少なく、さらに副生物の生成が少ないカルボキシル基含有ポリオキシアルキレン化合物を提供することである。

【図面の簡単な説明】

【図1】製造例1で得た化合物の赤外吸収スペクトルを

示す。

【図2】製造例1で得た化合物のGPCの微分積分分子量分布曲線を示す。

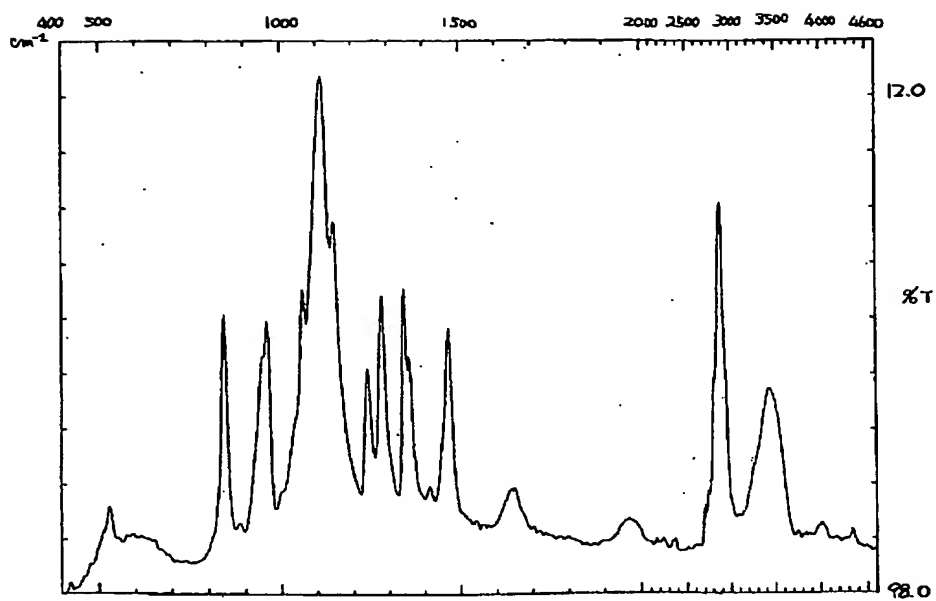
【図3】製造例2で得た化合物のGPCの微分積分分子量分布曲線を示す。

【図4】製造例3で得た化合物のGPCの微分積分分子量分布曲線を示す。

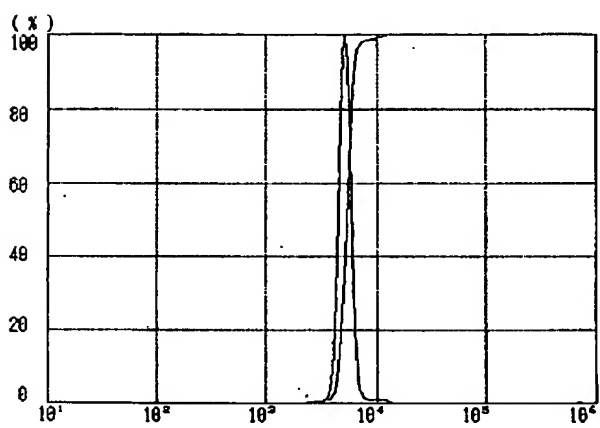
【図5】実施例1で得た化合物の赤外吸収スペクトルを示す。

【図6】実施例4で得た化合物の赤外吸収スペクトルを示す。

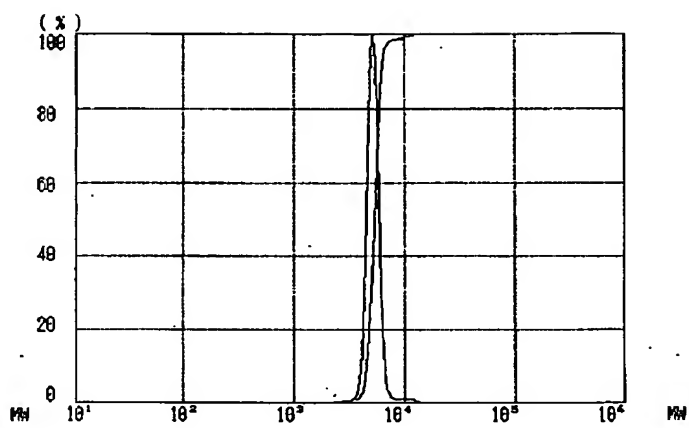
【図 1】



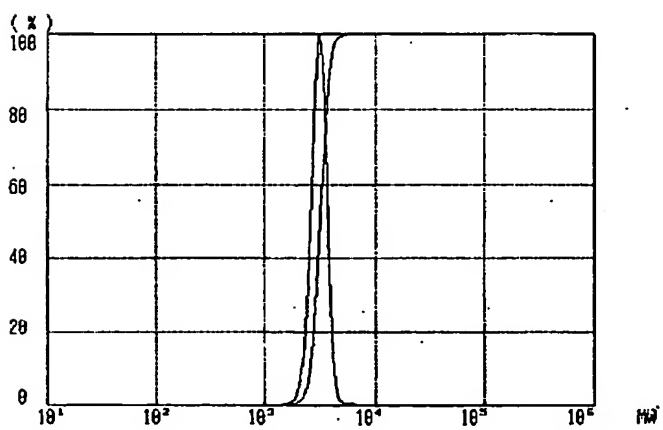
【図 2】



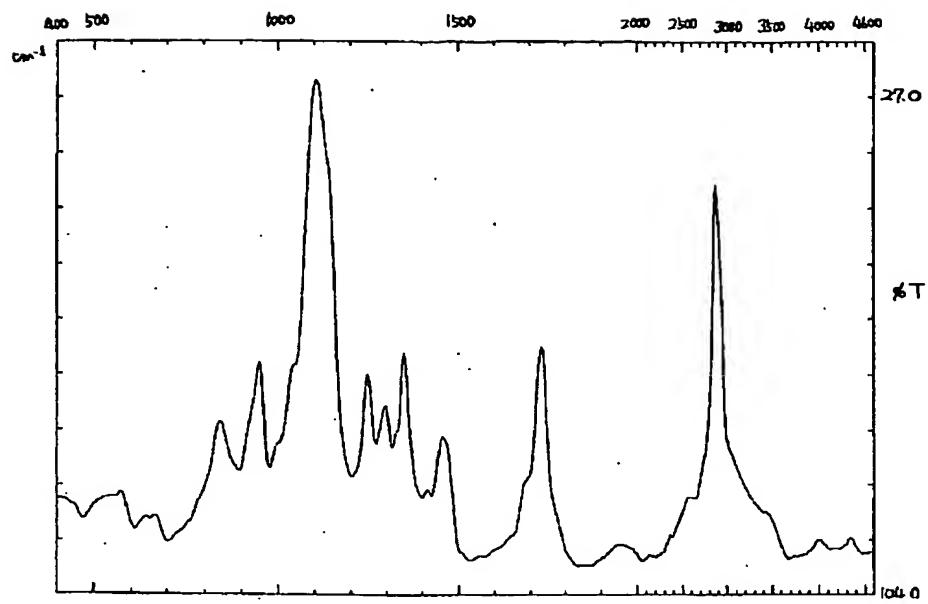
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【図 6】

